

培養細胞を用いた内分泌かく乱化学物質検出系の検討

分担研究者 塚田 俊彦 国立がんセンター研究部  
細胞増殖因子研究部受容体研究室室長

研究要旨

新しい内分泌かく乱化学物質検出系として、Neuron-derived orphan receptor-1 遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子につなぎ、これを Balb3T3 細胞に導入して安定した形質転換細胞（3T3NL 細胞）を作製した。この細胞を用いた検出系では、膜受容体を介するシグナル伝達をかく乱する物質を約3時間で検出することができた。

A. 研究目的

培養細胞を用いて、膜受容体を介するシグナル伝達系をかく乱する物質のスクリーニングに使用可能な、簡便で鋭敏な検出系を開発する。培養細胞として多種類の細胞を用いることができるように、組織非特異的な発現をする遺伝子のプロモーター活性を指標とする系とし、その感度等を検討する。

B. 研究方法

ルシフェラーゼをレポーター遺伝子として、神経由来オーファン受容体 (Neuron-derived orphan receptor-1, NOR-1) 遺伝子プロモーター活性が検出できる安定した形質転換培養細胞株を作製する。この細胞を用いて、A キナーゼ及び C キナーゼを活性化する物質の NOR-1 プロモーター活性への影響の検討をおこなう。各種刺激による NOR-1 遺伝子発現の変化を調べ、この検出系で検出可能な内分泌かく乱物質の種類を検討する。

(倫理面への配慮)

- 本研究においては、直接ヒト又は動物の生体を対象とする実験は行わない。

C. 研究結果

NOR-1 遺伝子がほとんど全ての組織で発現していること、および検討した多種類の培養細胞のすべてにおいて発現が認められることは既に報告した。また、これまでに A キナーゼや C キナーゼを活性化する物質による刺激で、NOR-1 mRNA が急激に誘導されることがわかっている。本年度はさらに、乳癌培養細胞株 MCF-7 において、種々のステロイ

ドホルモンで刺激実験を行ったが、ほとんど NOR-1 mRNA 量に変化を来さないことがわかった。この遺伝子のプロモーター領域の種々の長さの DNA 断片をルシフェラーゼ遺伝子につなぎ、このキメラ遺伝子を数種類の培養細胞に一過性に導入したところ、約 4000 塩基対の断片が強いルシフェラーゼ活性を発現させた。また、この約 4000 塩基対のプロモーター領域からの転写は、カルシウムイオノフォア A23187 による刺激によって増強されることがわかった。

この約 4000 塩基対の NOR-1 遺伝子プロモーター領域をもつキメラ遺伝子をネオマイシン耐性遺伝子とともに、マウス Balb3T3 細胞に導入し、24 個のネオマイシン耐性クローンを得た。これらのクローンのそれぞれを  $1 \mu\text{M}$  フォルスコリンで 3 時間の刺激をした後ルシフェラーゼ活性を測定したところ、約半数のクローンでルシフェラーゼ活性が測定可能であった。そのうち、特にルシフェラーゼ活性が高かった 5 クローンについて、 $1 \mu\text{M}$  フォルスコリンによる刺激の前後で比較したところ、全てのクローンでルシフェラーゼ活性の誘導が認められた (図 1)。

これらのうち特に誘導幅が大きかった 1 クローン (3T3NL 細胞) について  $10 \mu\text{M}$  フォルスコリンまたは  $100 \text{ nM}$  12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) による刺激を行い、ルシフェラーゼ活性の時間経過を検討した。その結果、フォルスコリンおよび TPA のいずれによっても、約 3 時間で頂値に達する一過性の酵素活性誘導が認められた (図 2)。誘導幅はフォルスコリンでは約 40 倍と大きかったが、

TPA では約 3 倍であった。このことから、この系は A キナーゼ系を介する刺激に対しては鋭敏に反応するが、C キナーゼ系の刺激に対しては反応が鈍いこと示唆された。

#### D. 考察

昨年度報告した、PC12 細胞を用いた内分泌かく乱物質検出系 (PC12VG 細胞) では vasoactive intestinal peptide (VIP) 遺伝子のプロモーターにつないだベータガラクトシダーゼをレポーター遺伝子とした。VIP 遺伝子のプロモーターは、副腎髄質細胞由来の PC12 細胞など、特殊な神経内分泌細胞においてのみ高いプロモーター活性を示すため、多くの細胞ではこのプロモーターを使用できなかった。今年度は、用いることができる培養細胞の種類の点で汎用性をもたせるため、ほとんど全ての細胞で内因性に発現しており、種々の刺激に対して転写活性が上昇することが知られている NOR-1 遺伝子プロモーターの利用を試みた。レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いたため、ベータガラクトシダーゼと比べて酵素活性の測定手技がやや煩雑となったが、基礎値も十分感度以上になるなどの利点があった。

NOR-1 遺伝子プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子をつないだキメラ遺伝子を安定して発現する細胞株の 1 クローン (3T3NL 細胞) は、フォルスコリンによる刺激に対し、約 3 時間後に基礎値の約 40 倍に至るルシフェラーゼ活性誘導を示した。これは、PC12VG 細胞におけるベータガラクトシダーゼ活性が、同様の刺激後約 6-8 時間で頂値に到達したのと比べて、より迅速な反応であった。一方、TPA による誘導は PC12VG 細胞と同様に反応が低かった。このことより、3T3NL 細胞も PC12VG 細胞と同様に、A キナーゼ系を介するシグナル伝達系に作用する物質の検出には感度の良い検出系と考えられる。また、内因性の NOR-1 mRNA はカルシウムイオノフォア、インスリンや epidermal growth factor などの各種増殖因子、shear stress や磁場などの物理的刺激により増加することが知られており、種々の培養細胞を親細胞とすることにより、様々な生物作用の検出系の作製に利用できると考えられる。

#### E. 結論

NOR-1 遺伝子プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子につないだキメラ遺伝子を安定して発現する培養細胞 3T3NL 細胞を得た。この細胞は A キナーゼ系を介するシグナル伝達系に作用する物質を迅速に検出する系として適している。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ohkura N, Hosono T, Maruyama K, Tsukada T and Yamaguchi K. The human NGFI-B gene gives rise to two isoforms with different expression profiles. *Biomed Res* 29 (4): 213-218, 1999

Nagasaki K, Maass N, Manabe T, Hanzawa H, Tsukada T and Yamaguchi K. Identification of a novel gene, *LDOL1*, down-regulated in cancer cell lines. *Cancer Lett* 140: 227-234, 1999

Nagasaki K, Manabe T, Hanzawa H, Maass N, Tsukada T, Kikuchi K and Yamaguchi K. Identification of a novel gene, *DAM1*, amplified at chromosome 1p13.3-21 region in human breast cancer cell lines. *Cancer Lett* 140: 219-226, 1999

Nagasaki K, Sasaki K, Maass N, Tsukada T, Hanzawa H and Yamaguchi K. Staurosporine enhances cAMP-induced expression of neural-specific gene VGF and tyrosine hydroxylase. *Neurosci Lett* 267: 177-180, 1999

Ohkura N, Hosono T, Maruyama K, Tsukada T and Yamaguchi K. An isoform of Nurr1 functions as a negative inhibitor of the NGFI-B family signaling. *Biochim Biophys Acta* 1444: 69-79, 1999

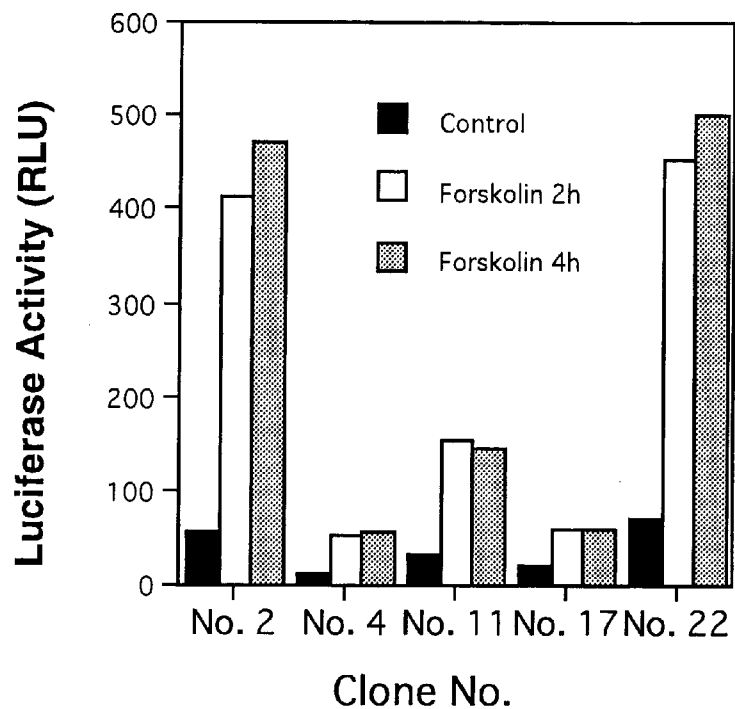


図1. NOR-1遺伝子プロモーター/ルシフェラーゼのキメラ遺伝子を安定導入したBalb3T3細胞の各クローンにおける1  $\mu$ M フォルスコリン処理によるルシフェラーゼ活性の誘導。

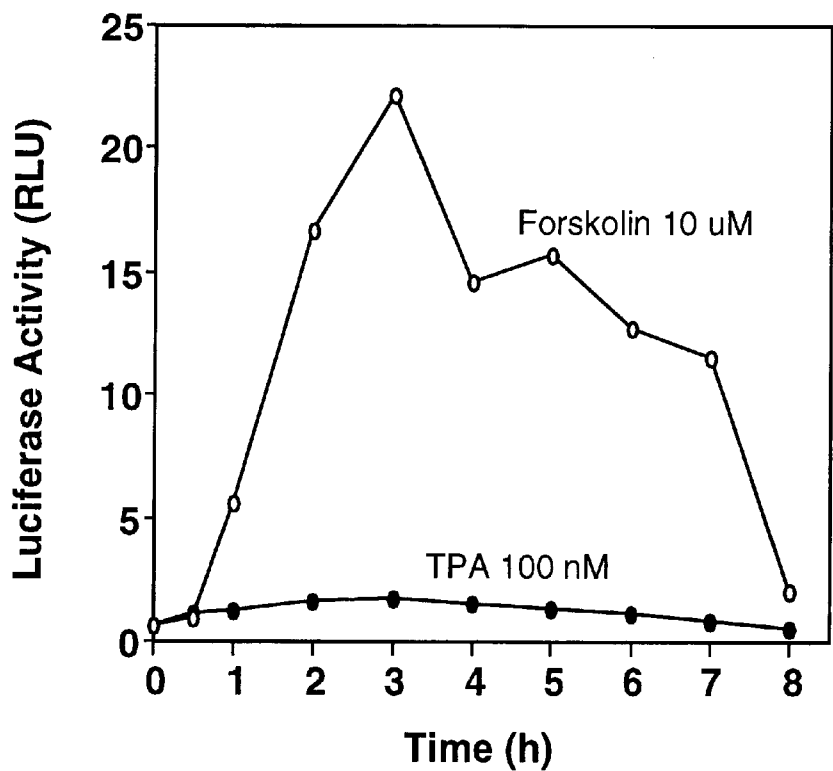


図2. 3T3NL細胞における10  $\mu$ Mフォルスコリン又は100 nM TPAによるルシフェラーゼ活性の誘導の時間経過